

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

NATASCHA WOSNICK

**PLASTICIDADE OSMORREGULATÓRIA EM *Centropomus parallelus*
(Poey, 1860) – ROBALO-PEVA**

**Curitiba
2009**

NATASCHA WOSNICK

**PLASTICIDADE OSMORREGULATÓRIA EM *Centropomus parallelus*
(Poey, 1860)- ROBALO-PEVA**

Monografia de Conclusão de Curso
de Graduação em Ciências
Biológicas, apresentado ao
Departamento de Fisiologia, do
Setor de Ciências Biológicas, da
Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a. Dra. Carolina
Arruda de Oliveira Freire.

**Curitiba
2009**

À minha mãe Marilene Wosnick

AGRADECIMENTOS

Dedico este trabalho, tal como todo o resultado de meus esforços a todos aqueles que estiveram presentes de alguma forma em minha vida, e me influenciaram de alguma maneira em minhas escolhas.

À minha mãe, minha fonte de inspiração, que nunca duvidou de minha capacidade, nunca pôs em questionamento minhas decisões e sempre esteve ao meu lado, cada dia mais orgulhosa e empolgada com minhas conquistas profissionais e minhas vontades de bióloga.

Agradeço especialmente à Profa. Carolina Arruda de Oliveira Freire, por ter me recebido de braços abertos e por ter me ensinado, tanto profissionalmente, quanto como pessoa, me mostrando que respeito, verdade e trabalho árduo, formam um verdadeiro profissional. Agradeço também a todos os colaboradores do projeto, Profa. Rosana por me auxiliar com a realização das dosagens de cortisol, e por ter aceitado trabalhar conosco; Ao Dr. Fabiano Bendhak, coordenador do Projeto Robalo, por toda a ajuda e apoio. Agradeço também à Ana Paula, ao Leandro e a todos os funcionários do CPPOM, que além de cederem os exemplares e as instalações para que este trabalho fosse possível, me ajudaram de todas as formas possíveis, além de me ensinarem tanto.

Gostaria de citar também todo o pessoal do laboratório de Fisiologia Comparativa da Osmorregulação (LFCO) e a Profa. Viviane Prodocimo, agradecendo muito por toda a ajuda e paciência.

Por fim, gostaria de agradecer a todos os meus grandes amigos, dentro e fora da faculdade, os quais tornaram meus dias mais completos e minha passagem pela faculdade mais proveitosa, divertida e cheia de ensinamentos, os quais levarei pelo resto da vida. Agradeço por todos os momentos felizes, de coração.

Obrigada a todos, pelos grandes ensinamentos e pelos longos momentos de alegrias e autoconhecimento. Irei levá-los em meu coração para sempre.

RESUMO

A espécie de teleósteo nativa *Centropomus parallelus* apresenta grande interesse comercial. Os peixes desta espécie são animais eurihalinos capazes de habitar desde a água do mar até a água doce. Esta flexibilidade na capacidade osmorregulatória apresentada pelo robalo-peva pode ser de grande utilidade em sua criação em cativeiro. O conhecimento da fisiologia e da capacidade de manutenção da homeostase nestes animais é de grande importância, inclusive para subsidiar a flexibilização do seu cultivo. O presente estudo teve como objetivo testar a plasticidade osmorregulatória desta espécie em protocolo de redução de salinidade (5‰ por dia), iniciando o experimento em 30‰ até chegar à salinidade 0‰. Foram utilizados 6 animais para cada salinidade testada, totalizando 48 animais, divididos em 8 aquários com o mesmo protocolo de redução de salinidade. Durante o experimento os animais permaneceram em jejum para evitar alterações nas leituras de glicose. Diariamente todos os 6 peixes de um mesmo aquário eram amostrados. Os peixes eram anestesiados com benzocaína (1g/20L), sendo em seguida pesados e medidos, e uma amostra de sangue obtida por punção da veia caudal. A osmolalidade e as concentrações de cloreto, magnésio, glicose e cortisol plasmáticos foram analisados no plasma. Houve grande estabilidade nos valores de osmolalidade e da glicose, e dos íons cloreto e magnésio no plasma do robalo. As únicas diferenças observadas foram: redução na osmolalidade entre o grupo em 25‰ quando comparado ao grupo 0‰ aclimatado por 7 dias; para o magnésio o valor dos grupos 25‰ e 0‰ (após 24 horas) foi superior ao do grupo em 0‰ aclimatado por 7 dias. Diferenças também foram encontradas relacionando o cortisol plasmático com o tempo de exposição à benzocaína. A anestesia com benzocaína induziu liberação de cortisol no plasma, sendo mais relevante do que a salinidade para explicar o cortisol plasmático. Constatou-se desta forma a grande plasticidade osmorregulatória da espécie, mantendo estreita homeostasia extracelular diante de sua transferência da água do mar para a água doce. Em consequência, pode ser assegurada sua flexibilidade para transporte e possivelmente para o cultivo, mesmo em águas interiores. Foi também interessante revelar a importância do controle do tempo de anestesia, quando se avalia cortisol no plasma destes peixes.

Palavras-chave: benzocaína; *Centropomus*; cloreto; cortisol; glicose; magnésio; osmolalidade; Robalo-peva; salinidade.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Exemplar de <i>Centropomus parallelus</i>	9
Figura 2- Distribuição da espécie.....	10
Figura 3- Troca iônica em células de teleósteos de água salgada.....	14
Figura 4- Troca iônica em células de teleósteos de água doce.....	14
Figura 5- Hormônios e suas atuações em água salgada e doce.....	15
Tabela 1- Relação hormônios x funções na osmorregulação em teleósteos....	16
Tabela 2- Hormônios e seus efeitos fisiológicos em teleósteos.....	16
Figura 6- Experimento (tanques CPPOM).....	19
Figura 7- Experimento (biometria).....	19
Figura 8- Experimento (medição comprimento dos animais).....	19
Figura 9- Experimento (pesagem dos animais).....	19
Figura 10- Experimento (aquários utilizados).....	20
Figura 11- Experimento (animais anestesiados com benzocaína).....	21
Figura 12- Experimento (coleta de sangue dos animais).....	21
Figura 13- Osmorregulação x salinidade.....	23
Figura 14- Cloreto x salinidade.....	24
Figura 15- Magnésio x salinidade.....	24
Figura 16- Glicose x salinidade.....	25
Figura 17- Cortisol x salinidade.....	26
Figura 18- Cortisol x tempo no anestésico.....	26
Figura 19- Cortisol x salinidade x tempo no anestésico.....	27

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	08
2 OBJETIVOS	18
3 MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1. OBTENÇÃO DOS ROBALOS	19
3.2. EXPERIMENTOS DE ACLIMATAÇÃO	19
3.3. AMOSTRAGENS E DOSAGENS	20
3.3.1. Osmolalidade, íons e glicose	21
3.3.2. Cortisol	21
3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA	22
4 RESULTADOS	23
5 DISCUSSÃO	28
6 CONCLUSÃO	33
REFERÊNCIAS	34

1. INTRODUÇÃO

A aquicultura pode ser definida como o processo de produção em cativeiro, de organismos com habitat predominantemente aquático como peixes. Um hectare cultivado com peixes produz mais do que qualquer hectare utilizando outro animal (SEAP, 2009). Peixes gastam relativamente pouca energia em funções como flutuabilidade e locomoção. Isso lhes garante uma maior conversão da energia contida nos alimentos consumidos em massa muscular, alcançando uma altíssima produtividade (SCHMIDT-NIELSEN, 1996). Devido à alta produtividade apresentada no cultivo destes animais em tempo relativamente curto, fica claro o aumento da importância da aquicultura no panorama do abastecimento alimentar mundial. Problemas ambientais causados por esta prática também estão presentes, tais como a poluição das águas e a baixa sustentabilidade a longo prazo. Tais problemas se devem em grande parte ao fato de ocorrer aumento na produtividade, porém sem um aumento na sustentabilidade. Tanto espécies nativas como espécies exóticas são produzidas pela atividade de aquicultura, muitas voltadas a fim comercial. O uso de espécies exóticas para cultivo gera certa polêmica devido a todos os problemas de impacto ambiental que esta introdução pode gerar. Defendida por grandes produtores e empresas fornecedoras de alimentos e criticada por diversos pesquisadores (GOZLAN, 2008; VITULE *et. al.*, 2009) e Organizações Não Governamentais, como o Greenpeace, o uso de espécies exóticas encontra-se em foco constante de discussão.

O cultivo sustentável é definido pela produção consciente, a fim de diminuir os danos causados ao ambiente, além da produção em quantidade suficiente para lucro dos produtores, levando também em consideração a preservação da espécie cultivada (EMBRAPA, 2009). Pesquisar espécies nativas com potencial comercial é uma das formas de proteger nossa biodiversidade ao mesmo tempo investindo na produção de alimentos pela aquicultura. Uma das mais importantes espécies nativas utilizadas na aquicultura e produção em larga escala é o robalo-peva, presente no litoral Brasileiro. O Projeto Robalo pode ser citado como exemplo, já que baseia toda sua produção no cultivo sustentável e na conscientização da comunidade local

da importância do cultivo de espécies nativas e da diminuição dos impactos ambientais (PROJETO ROBALO, 2009).

O robalo-peva pertence à Ordem Perciformes e é representante da família Centropomidae. Espécies desta família possuem grande valor comercial sendo encontradas em regiões tropicais e subtropicais costeiras, em ambientes estuarinos, lagunares e de água doce (GREENWOOD, 1976). A espécie *Centropomus parallelus* é conhecida popularmente por robalo-peva (sul e sudeste), ou ainda camorim ou peba (norte e nordeste), além de “fat snook” (América do Norte). Possui como principais características morfológicas cor geral prateada, dorso mais escuro e pigmentação escura esparsa nas nadadeiras dorsal, caudal e anal (Figura 1). Exemplares adultos possuem em média 50 cm e 3kg, e esta é a espécie de menor porte do gênero (ANUÁRIO BRASILEIRO DE PESCA ESPORTIVA, 2002). Sua distribuição se dá desde a costa da Flórida, até o litoral de Santa Catarina (Figura 2), na chamada costa atlântico-americana (ANUÁRIO BRASILEIRO DE PESCA ESPORTIVA, 2002). Apresenta carne de agrado ao paladar humano e fácil adaptação a diferentes ambientes, sendo desta forma, ideal para aplicação em aquicultura (BORBA *et al.*, 1996).



Figura 1. Exemplar de Robalo-peva, *Centropomus parallelus*.
(Fonte: Moro, 2008).



Figura 2. Distribuição geral do Robalo-peva, *Centropomus parallelus*.
(Fonte: www.fishbase.org).

O Robalo-peva apresenta hábito demersal (RIVAS, 1986), sendo encontrado em águas calmas, ficando próximo ao fundo. São animais eurihalinos. A salinidade ambiental mostra-se determinante para o desenvolvimento do robalo-peva, sendo importante para sua criação em cativeiro, a fim de maximizar o crescimento dos exemplares (TSUZUKI *et al.*, 2007). Um estudo realizado relacionando diferentes salinidades (0‰, 5‰, 15‰ e 35‰) com o desenvolvimento de juvenis da espécie *Centropomus parallelus* teve como objetivo determinar qual a concentração salina mais favorável ao seu crescimento (TSUZUKI *et al.*, 2007). Foi observado bom desenvolvimento dos peixes nas diferentes salinidades, comprovando assim seu elevado grau de eurihalinidade (TSUZUKI *et al.*, 2007). Apesar desta flexibilidade, indivíduos juvenis nesta espécie encontram-se melhor adaptados a níveis intermediários de salinidade, característica de ambientes estuarinos e lagoas costeiras (VARSAMOS *et al.*, 2006). Indivíduos recém-eclodidos parecem possuir mecanismos osmorregulatórios de grande eficiência capazes de permitir ao animal sua sobrevivência em ambientes de água doce, sendo a tolerância a maiores salinidades adquirida com o aumento da idade do animal (TSUZUKI *et al.*, 2007).

O custo energético para a regulação iônica e osmótica está relacionado com a salinidade do ambiente em peixes (e.g. BOEUF & PAYAN, 2001). Frequentemente, índices de sobrevivência altos em ambientes isosmóticos

podem ser explicados pela pouca energia usada, já que pela redução no gradiente entre o meio externo e o interno, o transporte de íons entre estes dois meios é reduzido. Tal energia é convertida em ganho de peso e desenvolvimento (BOEUF & PAYAN, 2001).

Os indivíduos da espécie *C. parallelus* são estuarino-dependentes (INSTITUTO NACIONAL DE LA PESCA, 2005) e diádromos, o que significa que migram livremente entre os ambientes de água doce e salgada (FAO, 2009). São classificados como anfídromos, ou seja, transitam entre os dois ambientes não apenas para fins reprodutivos (FISHBASE, 2009). Esta espécie pode ser classificada como catádroma (CHAVEZ, 1963; PATRONA, 1984), já que indivíduos maduros apresentam reprodução em água salgada. Porém, defende-se que estes peixes apresentam também reprodução em ambientes de baixa salinidade, sendo assim considerados também anádromos (ROJAS, 1972; ITAGAKI, 2005).

Os primeiros registros de desovas artificiais através da indução hormonal artificial datam dos anos 1990 (Laboratório de Piscicultura Marinha – Universidade Federal de Santa Catarina) (CERQUEIRA, 1991). Trabalhos visando o aperfeiçoamento das técnicas abriram espaço para a produção em massa desta espécie em cativeiro (CERQUEIRA, 2002; ALVAREZ-LAJONCHÈRE, 2004). O procedimento padrão no cultivo de robalo-peva é realizar a desova, a incubação e larvicultura na salinidade de 35‰ (CERQUEIRA, 2002; ARAÚJO, 2005). Como na natureza as larvas migram para regiões estuarinas, no entanto, é possível que a incubação em baixas salinidades possa aumentar sua sobrevivência. Tal conquista resolve o problema causado pelo excesso de pesca desta espécie no Brasil na década de 90 (FAO, 2001), além de maximizar sua produção em cativeiro para fins comerciais.

Apesar do conhecimento relatado acima de sua impressionante eurihalinidade, não há na literatura avaliações da sua capacidade de manutenção da homeostasia interna diante de desafios salinos. E muito menos, investigações dos mecanismos fisiológicos responsáveis. A homeostasia interna é de grande importância, pois ela garante que processos fisiológicos e bioquímicos ocorram regularmente (SCHMIDT-NIELSEN, 1996; HWANG & LEE, 2007). Teleósteos marinhos são hiposmóticos e perdem água

por osmose para o meio. Para compensar a perda bebem água do mar e secretam ativamente sais monovalentes pelas brânquias (Figura 3) e divalentes pelos rins (McCORMICK, 2001; HWANG & LEE, 2007). Teleósteos de água doce são hiperosmóticos em relação ao meio, produzem urina diluída devido à ação dos rins em eliminar a água ganha por osmose e absorvem ativamente íons pelo epitélio branquial (Figura 4) (HWANG & LEE, 2007).

A osmorregulação em teleósteos é resultado da ação epitelial principalmente das brânquias, intestino e rins (EVANS *et. al.*, 2005; HWANG & LEE, 2007). Através do epitélio intestinal, ocorre a absorção pela corrente sanguínea de 70 a 80% de toda a água ingerida pelos teleósteos marinhos, além da maior parte da absorção de NaCl e KCl presentes na água. Em um momento inicial, a água ingerida é diluída pela metade, apenas com a absorção passiva dos íons realizada pelo esôfago. A absorção de Na^+ no intestino é realizada pelos co-transportadores de sódio, potássio e cloreto (NKCC) presentes na membrana apical no epitélio intestinal, juntamente com a Na^+ , K^+ -ATPase presente na membrana basolateral (GROSELL *et. al.*, 2009). A absorção de cloreto ocorre por co-transportadores (NKCC) na membrana apical e por canais de cloreto na membrana basolateral (GROSELL, *et. al.* 2009).

Em peixes marinhos o ganho de magnésio é constante e o excesso é eliminado exclusivamente pelos rins (EVANS, 1979). Peixes de água doce apresentam captação ativa de magnésio, pois a perda para o meio é constante (HWANG & LEE, 2007). A concentração de magnésio no fluido extracelular é baixa, enquanto a concentração dentro das células deve sempre estar elevada para que enzimas sejam ativadas e seus sítios possam ser modificados quando necessário (COWAN, 1995). Outros papéis do magnésio incluem a regulação da atividade dos transportadores $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ e K^+/Cl^- , da permeabilidade da membrana e da inserção de proteínas na mesma (FLATMAN, 1993; PUSCH *et. al.*, 1989; EBEL & GÜNTHER, 1980).

As brânquias em teleósteos marinhos e de água doce são organizadas de maneira um pouco diferente. Células pavimentosas, células de cloreto e células acessórias constituem o epitélio branquial (EVANS *et. al.*, 2005). As células pavimentosas desenvolvem importante papel nas trocas gasosas das brânquias com o meio. Possuem cristas em seu lado apical, apresentam baixa quantidade de mitocôndrias e grande quantidade de vesículas no citoplasma

(EVANS *et. al.*, 2005). Nas brânquias de teleósteos ducícolos, as células pavimentosas parecem também apresentar participação na captura iônica. As células pavimentosas de peixes de água doce apresentam uma H^+ -ATPase vacuolar e canais de Na^+ na membrana apical. A ATPase bombeia H^+ para fora das brânquias, garantindo o gradiente eletroquímico que irá trazer Na^+ para as células.

Células de cloreto aparecem em menor quantidade no epitélio branquial. São células com alta concentração mitocondrial, polarizadas e apresentam diferenças estruturais entre a membrana apical e basolateral (EVANS *et. al.*, 2005). Tais células são responsáveis pela secreção transcelular de Cl^- pelas brânquias em teleósteos de água salgada. As células de cloreto em teleósteos marinhos apresentam invaginações da membrana basolateral. Estas invaginações são os sítios de localização da Na^+ , K^+ -ATPase (EVANS *et. al.*, 2005). As células de cloreto em peixes dulcícolos possuem função de absorção de Ca^{2+} do meio. Estas células em teleósteos de água doce apresentam grande quantidade de H^+ -ATPases, além de transportadores de ânions (EVANS *et. al.*, 2005).

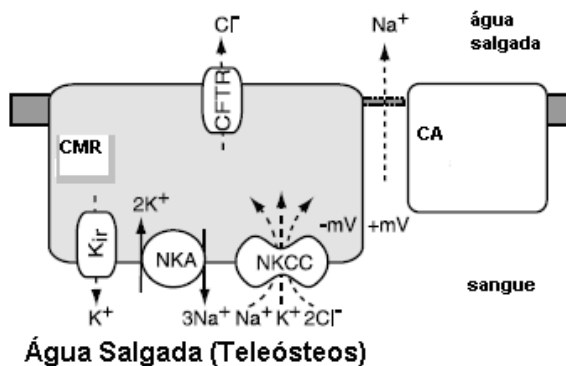
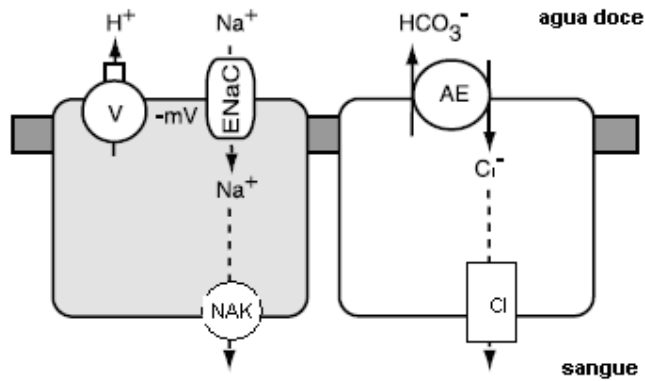


Figura 3. Modelo representativo do mecanismo de secreção de NaCl nas brânquias em peixes de água salgada. Na^+ , K^+ e Cl^- entram na célula via cotransportador (NKCC) localizado na membrana basolateral. Na^+ volta para o plasma via Na^+ , K^+ -ATPase (NKA). K^+ volta para o plasma via canais de K^+ (Kir). O Cl^- é secretado para o meio via canal de Cl^- (CFTR) localizado na membrana apical. O potencial elétrico criado pela saída do potássio basolateral permite a passagem de Na^+ para a água entre as junções celulares (CMR e CA).
Fonte: (EVANS *et. al.*, 2005).



Água doce (Teleósteos)

Figura 4. Modelo representativo do mecanismo de absorção de íons nas brânquias em peixes de água doce. A H^+ -ATPase (V) apical proporciona o gradiente elétrico necessário para a entrada de Na^+ via canal (ENaC) e Cl^- via trocador (AE). A Na^+ , K^+ -ATPase realiza o transporte basolateral do Na^+ , e a passagem do Cl^- para o meio interno se dá por provável canal de Cl^- . Modificado de EVANS *et. al.*, 2005.

Em teleósteos eurihalinos como o robalo-peva o epitélio das brânquias possivelmente varia de modo a se adaptar a necessidade de secretar sal em água salgada ou absorver sal em água doce. Variações na síntese e na degradação de componentes moleculares dos sistemas de transporte presentes no epitélio e a variação morfológica e numérica das células de cloreto são algumas adaptações apresentadas por outros peixes já estudados (EVANS *et. al.*, 2005). É clara a influência do sistema neuroendócrino na absorção e secreção de íons, sendo a liberação de hormônios como o cortisol, GH/IGF-I e a prolactina de grande importância para os mecanismos de osmorregulação (Tabela 1) (McCORMICK, 2001). O cortisol é considerado o hormônio mais importante para peixes de água salgada interagindo juntamente com o hormônio do crescimento GH/IGF-I e a prolactina o mais importante para peixes de água doce, agindo também juntamente com o cortisol (McCORMICK, 2001). A interação do cortisol com ambos parece criar a plasticidade osmorregulatória apresentada pelos peixes eurihalinos (McCORMICK, 2001) (Figura 5). A interação do hormônio do crescimento com o cortisol possui como função a regulação da secreção de sal pelas brânquias dos peixes. Quando ocorre aumento nos níveis de ambos os hormônios, ocorre aumento da estimulação da Na^+ , K^+ -ATPase. Tal aumento leva a uma maior secreção de sal pelas brânquias (MADSEN, 1990; McCORMICK, 1995) (Figura 5). A

interação do cortisol com a prolactina irá apresentar efeito antagônico ao efeito apresentado pela interação com o hormônio de crescimento, levando a um aumento na absorção de sal pelas brânquias. O cortisol também apresenta importante papel na captação de íons do meio; quanto mais elevados forem os níveis de cortisol no plasma, maior será a captação de íons apresentada (Tabela 1) (McCORMICK, 2001).

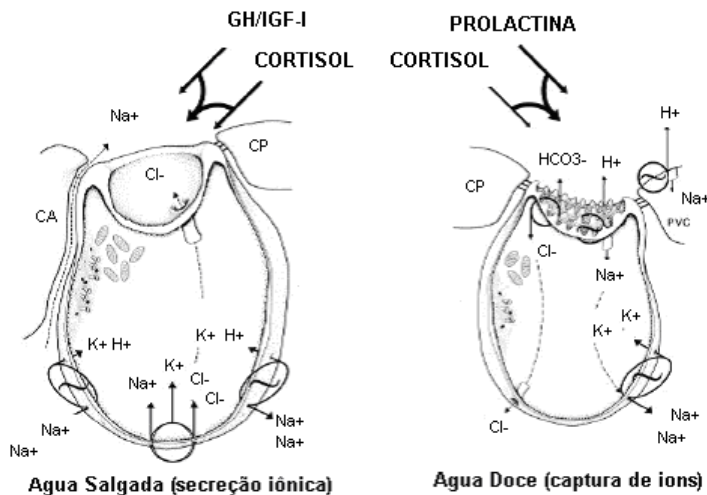


Figura 5. Esquema da influência dos hormônios sobre os mecanismos de transporte de íons em células de cloreto de brânquias de peixes de água salgada e doce, respectivamente. Fonte: (EVANS *et. al.*, 2005).

Quando ocorre migração de um peixe da água doce para a água salgada ocorre a diminuição na atividade da H^+ -ATPase, pois a absorção de Na^+ não é mais necessária. O influxo de Na^+ vindo da água salgada causa um aumento nos níveis plasmáticos deste íon, o que leva à secreção de cortisol pelo sistema endócrino do animal (McCORMICK, 2001). O aumento do cortisol plasmático juntamente com o aumento na concentração do hormônio do crescimento levam ao aumento do número de células de cloreto. Tal aumento irá levar a uma maior secreção de sal e maior atividade da Na^+ , K^+ -ATPase nas brânquias (Tabela 2). Quando ocorre migração da água salgada para a água doce, ocorre o oposto, levando o animal a se adaptar a baixas salinidades. Nota-se uma diminuição dos espaços entre as células branquiais e a redução da perda de sal. O aumento de prolactina no sangue irá inibir a atividade das células de cloreto. Por fim, nota-se o aumento na atividade da H^+ -ATPase

responsável pela captura de sal necessária para a sobrevivência em água doce (Tabela 2) (MADSEN, 1990; McCORMICK, 1995).

Cortisol	Cria plasticidade osmorregulatória, interage com o hormônio de crescimento em água salgada e com a prolactina em água doce.
Prolactina	Relacionada à adaptação em água doce, diminui atividade de células de cloreto e ativa a H^+ -ATPase.
GH/IGF-I	Relacionado à adaptação em água salgada.

Tabela 1. Hormônios relacionados à função osmorregulatória em teleósteos

Fonte: (RANDALL et. al., 2000, MADSEN, 1990; McCORMICK, 1995, McCORMICK, 2001).

Cortisol + GH/IGF-I	Aumento na liberação de sal pelas brânquias, aumento na atividade da Na^+ , K^+ -ATPase, aumento na tolerância de altos valores de salinidade e aumento no número das células de cloreto.
Cortisol + Prolactina	Aumento na absorção de sal pelas brânquias, diminuição da perda de sal, diminuição no número de células de cloreto e no espaço entre as células branquiais.

Tabela 2. Relação apresentada entre os hormônios e seus efeitos fisiológicos.

Fonte: (RANDALL et. al., 2000, MADSEN, 1990; McCORMICK, 1995, McCORMICK, 2001).

O cortisol é também hormônio associado a situações de estresse (WENDELAAR BONGA, 1997). Índices elevados de cortisol e glicose no sangue podem indicar condições de estresse em peixes (TAKAHASHI *et. al.*, 2006). O cortisol possui efeito significativo sobre o metabolismo da glicose. Sua deficiência causa hipoglicemia, e seu excesso causa o efeito contrário, aumentando a resistência à insulina. O aumento nos índices de glicose durante situação de estresse se mostra de extrema importância, já que grandes demandas de energia são necessárias para ativação dos mecanismos apresentados como resposta a uma situação adversa (WENDELAAR BONGA, 1997). Mudanças bruscas de ambiente são estímulos que aumentam o nível de estresse. Durante o cultivo de animais aquáticos o estresse causado pelo

manejo é inevitável, podendo levar muitas vezes à morte do animal (TAKAHASHI *et al.*, 2006). As respostas de estresse são classicamente separadas em três categorias: primária, secundária e terciária. As respostas primárias são hormonais, em geral causando um aumento na concentração plasmática de catecolaminas e cortisol. As secundárias são as mudanças em parâmetros como glicose e íons no sangue, além de parâmetros hematológicos. As terciárias relacionam-se ao comprometimento do crescimento e da reprodução, às mudanças no comportamento e ao aumento da susceptibilidade a doenças (WENDELAAR BONGA, 1997).

A fim de se evitar a diminuição do crescimento, morte dos indivíduos e conseqüente perda na produtividade é importante medir as concentrações de cortisol, glicose e de íons no plasma nos processos de transporte e aclimação (TAKAHASHI *et al.*, 2006). Com a diminuição dos níveis de cortisol, o crescimento, a taxa de sobrevivência e a produção dos peixes serão maiores. Dado este motivo, é de grande importância comercial criar ambientes que ofereçam um mínimo de estresse. Com a análise dos níveis de cortisol e glicose, pode-se ter idéia de qual ambiente é o mais apropriado.

2. OBJETIVOS

Objetivos gerais:

Avaliar a plasticidade osmorregulatória de robalo-peva em protocolo de redução de salinidade.

Objetivos específicos:

- Avaliar a homeostasia osmótica, de cloreto e magnésio plasmáticos no robalo-peva diante de redução de salinidade da água do mar até água doce;
- Avaliar o estresse envolvido com o protocolo de redução de salinidade no robalo-peva através da dosagem da glicose e cortisol plasmáticos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Obtenção dos robalos e experimentos de aclimação

O experimento foi realizado no período de 18/09 até 08/10/2009 e iniciou-se nas instalações do CPPOM, localizado em Guaratuba, litoral do Paraná. A obtenção dos animais foi realizada a partir dos tanques presentes no centro e o experimento teve colaboração dos profissionais do projeto robalo (Figura 6).

Foram utilizados juvenis de robalo (Figuras 7, 8 e 9), nascidos em 27/11/2007, com 24 meses, peso médio de 77,4 g ($\pm 10,43$) e comprimento em torno de 16,9 cm ($\pm 0,73$), provenientes de reprodução induzida.



Figura 6. Tanques de onde os animais foram retirados (CPPOM).



Figura 7. Biometria dos animais.



Figura 8. Medição do comprimento dos animais.



Figura 9. Peso médio dos animais.

Quarenta e oito peixes foram capturados do tanque de engorda e transferidos para oito aquários (seis peixes por aquário) com salinidade de 30‰ e alimentação à vontade durante sete dias para estabilização das respostas ao estresse provocado pela captura (Figura 10). A ração oferecida aos animais foi desenvolvida pelos pesquisadores e técnicos CPPOM, sendo

composta por farinha de peixe, farelo de soja, farinha de trigo, amido de milho, óleo de soja, vitamina C e complexo vitamínico-mineral (Comunicação não oficial).

Após o período de aclimação nos aquários, os peixes foram submetidos a jejum pelo período de 48 horas e o jejum foi mantido até o fim do experimento. Após a coleta controle (30‰ – seis peixes), foi iniciada a redução gradual de salinidade com velocidade de 5‰ dia⁻¹ até atingir 0‰ de salinidade nos aquários que ainda não haviam sido amostrados através da renovação contínua de água doce tratada pelo período de seis horas ou até a total estabilização da salinidade desejada. A água utilizada para tal redução foi proveniente da rede de abastecimento da cidade e tratada previamente com tiosulfato de sódio para neutralização do cloro. A cada redução de salinidade (de 5‰ por dia) um dos aquários experimentais (com seus 6 peixes) era amostrado. Foram então realizadas 8 coletas de 6 animais cada em 30, 25, 20, 15, 10, 5, 0 (24 horas) e 0‰ (aclimatados por 7 dias). Estes animais (em 0‰ por 7 dias) receberam o mesmo tratamento pré-experimental com condições gerais e alimentação, e após 48 horas de jejum foram amostrados.



Figura 10. Aquários utilizados durante O período do experimento.

3.2. Amostragens e dosagens plasmáticas

No momento da coleta dos peixes, uma pequena quantidade não definida de benzocaína era adicionada ao aquário, para reduzir o estresse da captura dos peixes (procedimento padrão dos técnicos do CPPOM). Os 6 peixes eram então retirados do aquário com puçá e transferidos para um balde com água na mesma salinidade e benzocaína a uma concentração de 1g/20L (Figura 11). O sangue foi coletado por punção da veia caudal (Figura 12). As amostras de sangue foram centrifugadas por 10 minutos à 10°C (5000 rpm) para separação do plasma para análises e foram preservadas congeladas (mantidas a - 20°C) no CPPOM. Em seguida, as amostras foram transportadas para Curitiba em isopor com gelo laboratorial para o Laboratório de Fisiologia Comparada no Departamento de Ciências Fisiológicas da UFPR, onde foram armazenadas a - 20°C até o momento das análises.



Figura 11. Animais anestesiados com benzocaína 1g/20L.



Figura 12. Coleta de sangue pela veia caudal dos animais.

3.2.1. Osmolalidade, íons e glicose.

A osmolalidade do plasma foi determinada utilizando o micro-osmômetro de pressão de vapor VAPRO 5520 (Wescor, USA). As concentrações de cloreto e magnésio foram determinadas por colorimetria em espectrofotômetro (Ultrospec 2100 PRO Amersham Pharmacia biotech) utilizando kits comerciais (Labtest, Brasil) com leitura de absorbância em 470 nm e 505 nm respectivamente. A glicose plasmática foi também determinada por kits colorimétricos comerciais (Labtest), com leitura da absorbância em espectrofotômetro (505 nm).

3.2.2. Cortisol

As dosagens dos níveis de cortisol plasmático foram feitas segundo método estabelecido por Munro & Stabenfeldt (1984). Testes iniciais foram feitos com amostras sanguíneas de robalo-peva mantidos a 33‰, a fim de padronizar a metodologia para esta espécie. O anticorpo (policlonal R-4866, Universidade Califórnia Davis) foi diluído 1:8500 em solução de cobertura pH 9,6 e 50µl foram adicionados em cada poço da microplaca NUNC Maxisorb. A placa descansou por 12 horas a 4°C, para fixar o anticorpo no fundo da placa. Após este período, a placa foi lavada cinco vezes com solução de lavagem para Elisa (solução salina com detergente Tween 20) para a retirada do excesso de anticorpo. As amostras de plasma foram diluídas (1:128) em solução diluidora de Elisa (tampão fosfato pH 7,0) de modo a manter a concentração dentro da faixa de leitura da curva padrão e o conjugado (cortisol HRP) foi diluído 1:20.000.

Após diluição dos componentes da dosagem, a curva padrão foi preparada em triplicata, sempre com concentrações que variam de 3,9 a 1.000 pg de cortisol/poço em ordem crescente sobre o anticorpo que grudou na placa. Após a preparação da curva padrão, adicionou-se 50µl das amostras plasmáticas diluídas sobre o anticorpo e depois 50 µl do conjugado sobre as amostras e incubou-se a placa por 1 hora em temperatura ambiente. Em seguida a placa foi lavada cinco vezes com a mesma solução de lavagem de Elisa e foram adicionados 100 µl da solução de ABTS (H_2O_2 e solução citrato, pH 4,0) em cada um dos poços. A leitura de absorbância foi feita em 405 nm (ELISA ELX 800 Auto Reader da Meridian Diagnostics Inc).

3.3. Análise Estatística

Os dados foram analisados por ANOVA de uma via e teste *post hoc* de Tukey para localizar as diferenças, para comparação entre as amostras de todos os grupos experimentais, com limite de significância em 0,05. Os dados de cortisol também foram analisados por ANOVA de duas vias para a relação

entre o efeito do tempo em anestésico na redução de salinidade proposta. Os resultados são apresentados em gráficos, como média \pm erro padrão da média.

4. RESULTADOS

A osmolalidade do plasma do robalo-peva foi mantida extremamente estável diante do protocolo de redução progressiva da salinidade da água. Apenas a osmolalidade do plasma do robalo em 25‰ (345 mOsm/kg) foi superior a dos robalos após 7 dias em salinidade 0‰ – 0b (305 mOsm/kg) (Figura 13). O cloreto plasmático foi mantido totalmente estável durante todo o experimento, variando de 120 a 150 mM (Figura 14). A concentração de magnésio plasmático apresentou diferença significativa entre os animais do grupo mantido a 25‰ (1,2 mM) e os animais do grupo mantido por um dia em salinidade 0‰ - 0a (1,2 mM), quando comparados ao grupo aclimatado em salinidade 0‰ por 7 dias - 0b (0,7 mM) (Figura 15).

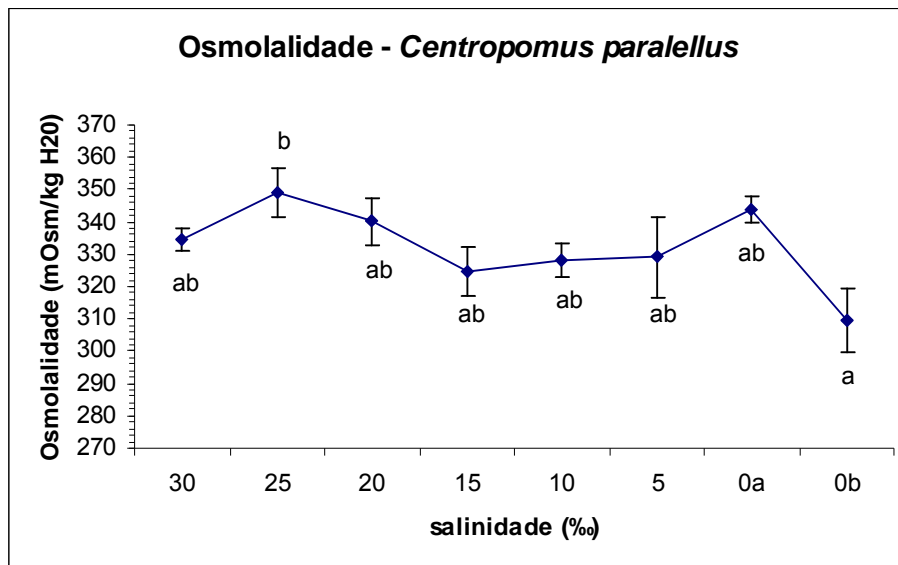


Figura 13. Osmolalidade plasmática (mOsm/kg H₂O) ao longo do protocolo de redução de salinidade, apresentada por indivíduos de *Centropomus parallelus*. 0a = após 24 h em água doce; 0b = após 7 dias em água doce. As letras representam o resultado da análise estatística. Grupos com letras em comum não são significativamente diferentes.

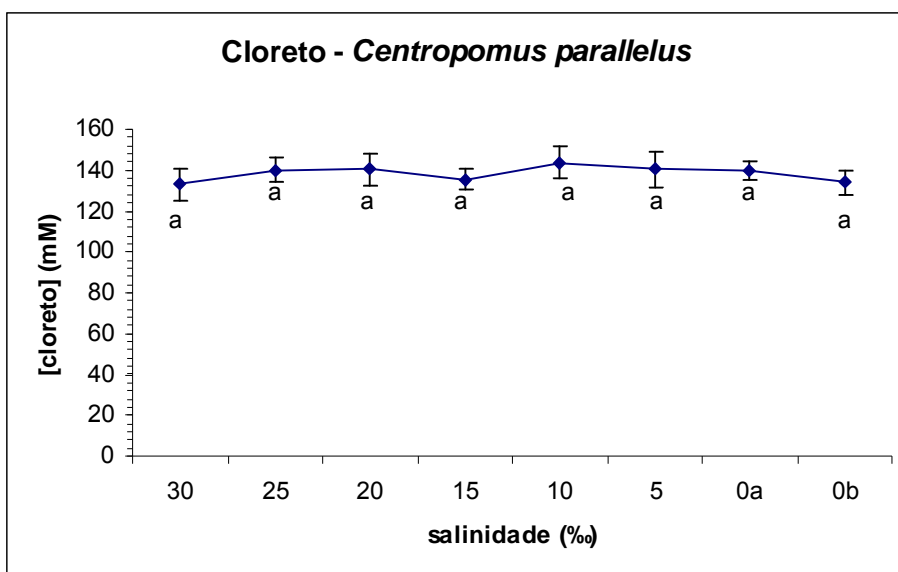


Figura 14. Concentração de cloreto plasmático (mM) ao longo do protocolo de redução de salinidade, apresentada por indivíduos de *Centropomus parallelus*. 0a = após 24 h em água doce; 0b = após 7 dias em água doce. As letras representam o resultado da análise estatística. Grupos com letras em comum não são significativamente diferentes.

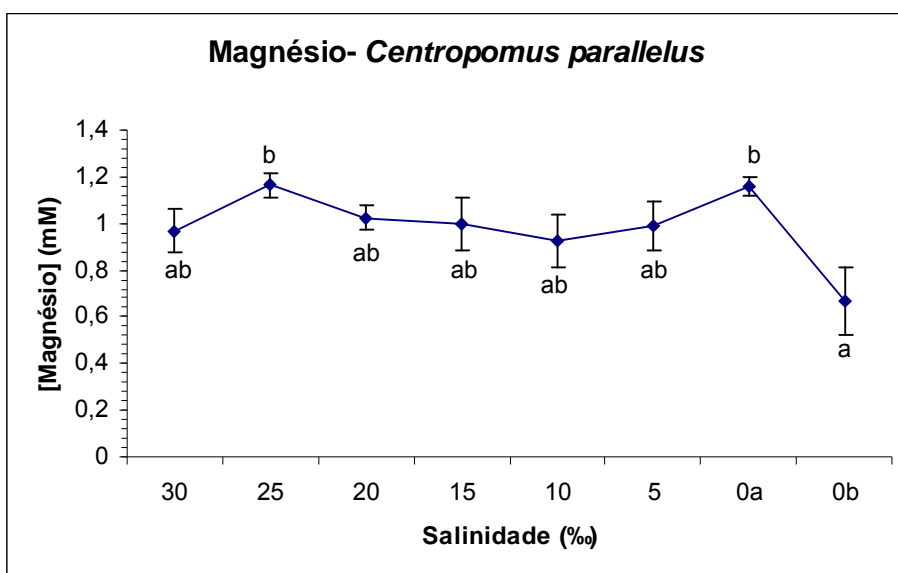


Figura 15. Concentração de magnésio plasmático (mM) ao longo do protocolo de redução de salinidade, apresentada por indivíduos de *Centropomus parallelus*. 0a = após 24 h em água doce; 0b = após 7 dias em água doce. As letras representam o resultado da análise estatística. Grupos com letras em comum não são significativamente diferentes.

Os valores de glicose plasmática não apresentaram diferença entre os grupos analisados, variando de 70- 140 (ng/ml) (Figura 16). As taxas de cortisol também não apresentaram diferença quando relacionadas com a redução de salinidade proposta pelo estudo, sendo a variação de 25-115 (ng/dL) (Figura

17).

Quando relacionadas com o tempo de exposição dos animais ao anestésico (benzocaína) as concentrações de cortisol apresentaram diferenças significativas entre cada tempo de exposição, sendo maiores quanto maior o tempo exposto à benzocaína (Figura 18).

Ao analisar as concentrações plasmáticas de cortisol com o tempo de exposição à benzocaína, relacionando ambos os fatores com os diferentes valores de salinidade usados pode-se perceber que houve relação entre o tempo de exposição ao anestésico, a concentração elevada de cortisol plasmático e a salinidade. Pode-se notar que os valores de cortisol mostram-se menores em salinidades mais baixas e em menor tempo de exposição ao anestésico. Assim como as concentrações foram mais elevadas quanto maior a salinidade e maior o tempo de exposição à benzocaína (Figura 19).

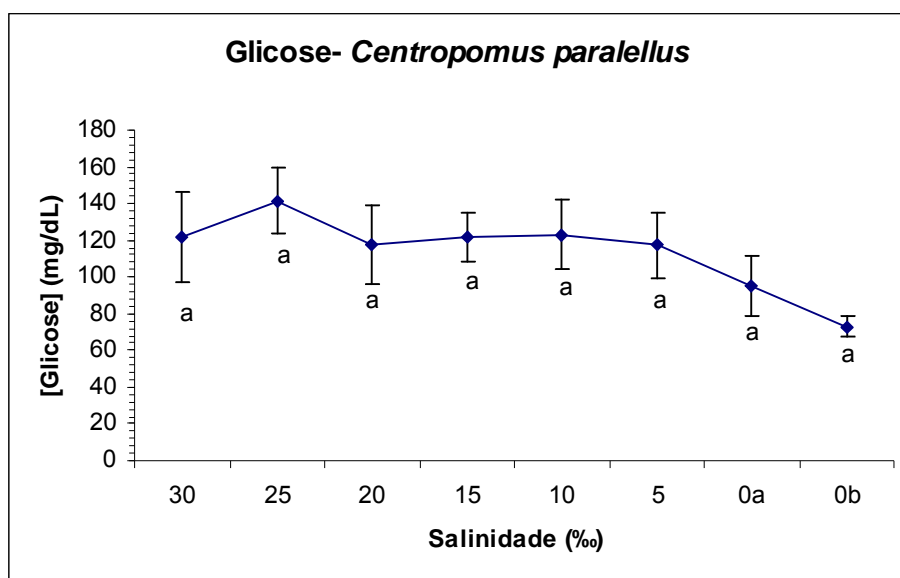


Figura 16. Glicose plasmática (mg/dL) ao longo do protocolo de redução de salinidade, apresentada por indivíduos de *Centropomus parallelus*. 0a = após 24 h em água doce; 0b = após 7 dias em água doce. As letras representam o resultado da análise estatística. Grupos com letras em comum não são significativamente diferentes.

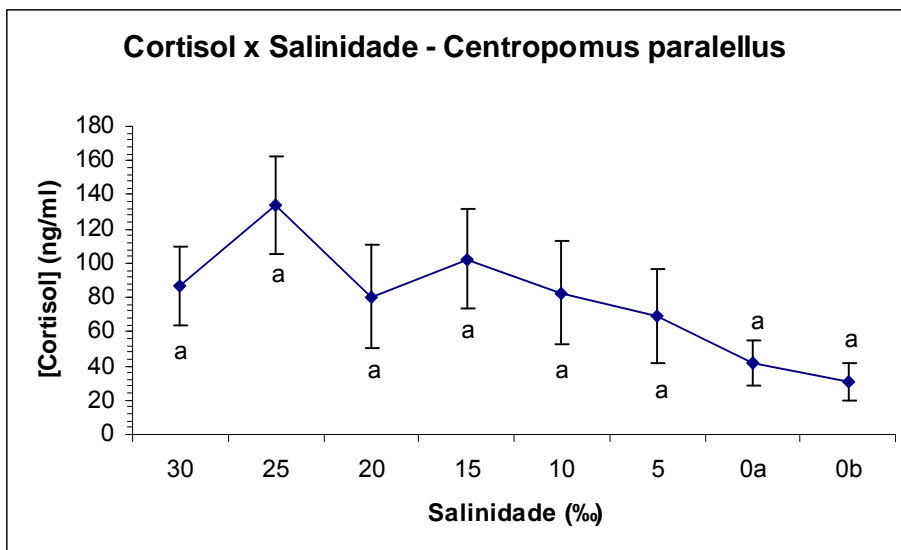


Figura 17. Cortisol plasmático (ng/mL) ao longo do protocolo de redução de salinidade, apresentado por indivíduos de *Centropomus paralellus*. 0a = após 24 h em água doce; 0b = após 7 dias em água doce. As letras representam o resultado da análise estatística. Grupos com letras em comum não são significativamente diferentes.

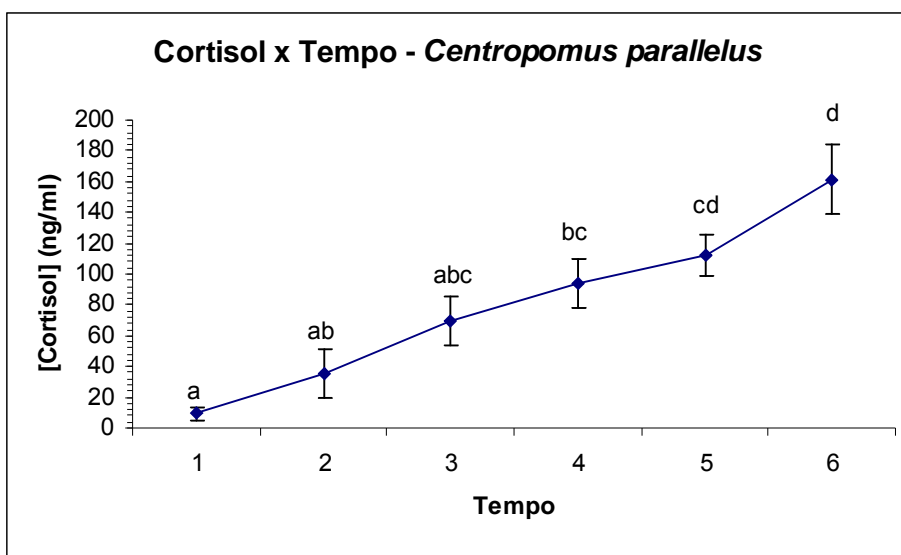


Figura 18. Cortisol plasmático em função do tempo de anestesia com benzocaína, para todas as salinidades juntas, a cada tempo de retirada dos peixes do balde de anestesia. Os tempos reais foram de: 1, ~2 min; 2, ~5 min; 3, ~10 min; 4, ~15 min; 5, ~20 min e 6, ~25 min de permanência sob anestesia. As letras representam o resultado da análise estatística. Grupos com letras em comum não são significativamente diferentes.

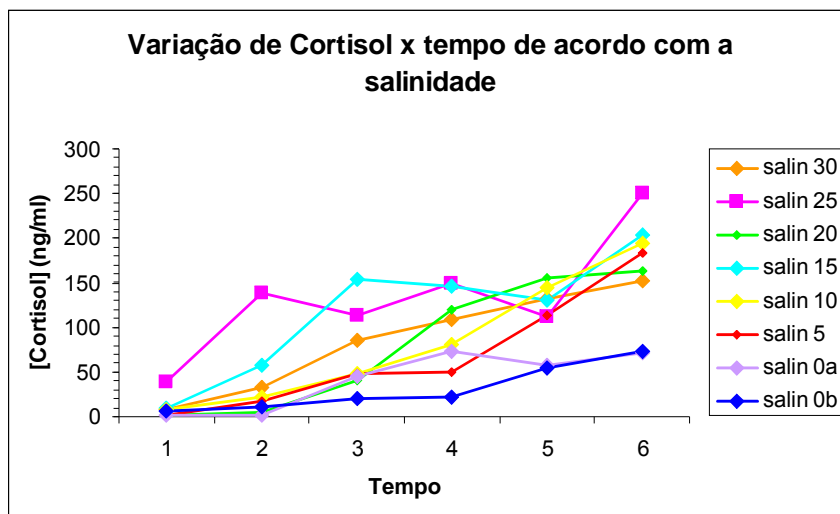


Figura 19. Cortisol plasmático ao longo do tempo de anestesia, para cada grupo de 6 animais submetidos a uma mesma salinidade. Os tempos reais foram de: 1, ~2 min; 2, ~5 min; 3, ~10 min; 4, ~15 min; 5, ~20 min e 6, ~25 min de permanência sob anestesia.

5. DISCUSSÃO

Indivíduos do gênero *Centropomus* são conhecidos por serem muito eurihalinos, ocorrendo desde a água do mar até em águas doces, e são muito importantes para a pesca comercial e esportiva (PIERANGELI *et. al.*, 1998). As concentrações de cloreto, glicose e cortisol não apresentaram diferença entre os grupos diante da redução de salinidade. Por outro lado, a osmolalidade e a concentração de magnésio mostraram diferença entre o grupo aclimatado a 25‰ e o grupo em 0‰. O cortisol apresentou diferença quando o critério tempo de exposição ao anestésico foi avaliado. Apesar destas diferenças estatísticas pontuais, foi bem clara a manutenção da estabilidade extracelular ao longo do protocolo de redução de salinidade. Tal aumento nos níveis de cortisol plasmático parece ser resultado do estresse causado pela anestesia nestes animais.

Estudos realizados por Cavalheiro *et. al.* (1998) indicam alta capacidade de sobrevivência de *C. parallelus* em ambientes de água doce. Esta sobrevivência está relacionada com a capacidade mostrada pela espécie em adaptar-se a diferentes salinidades, voltando a seu equilíbrio osmorregulatório rapidamente após mudanças na concentração iônica do ambiente, como foi de fato demonstrado com os resultados deste estudo. O pico nas concentrações plasmáticas visto em salinidade 25‰ pode ser explicado pelo desafio inicial oferecido a estes animais. Antes do início do experimento os grupos estavam aclimatados em salinidade 30‰ durante muito tempo, e a mudança para 25‰ pode ser considerada como uma perturbação inicial para estes animais. Estudo realizado com baiacus de duas diferentes espécies (*Sphoeroides greeleyi* e *S. testudineus*), que apesar de não apresentarem tolerância tão ampla a água doce quanto o robalo-peva, possuem efetiva capacidade osmorregulatória, mostrou queda nos valores de osmolalidade quando os baiacus foram expostos a protocolo de diluição de água do mar de 35‰ para 5‰ (PRODOCIMO *et. al.*, 2008). Estudo realizado com *Fundulus heteroclitus* em protocolo de redução de salinidade também apresentou queda nos valores de osmolalidade (MARSHALL *et. al.*, 2000). A redução na osmolalidade do plasma dos robalos após 7 dias em salinidade 0‰ ocorreu em relação aos valores de 25‰, mas

mesmo assim, o padrão observado foi de extrema estabilidade, ou manutenção da homeostasia osmo-iônica.

As concentrações de cloreto observadas não apresentaram diferença ao longo do gradiente de salinidade neste estudo, o que vem a corroborar resultados obtidos com *Sphoeroides greeleyi* e *S. testudineus* em protocolo de redução de salinidade que também não apresentaram diferença na concentração de cloreto (PRODOCIMO *et. al.*, 2008). A grande capacidade osmorregulatória da espécie pode ser o motivo pelo qual não foram observadas diferenças nas concentrações de cloreto, confirmando assim a plasticidade da espécie. Pode-se concluir também que a redução nos valores da osmolalidade não foram influenciados pela concentração de cloreto plasmático. Dito isso fica clara a importância na realização de leituras de Na^+ a fim de se tentar avaliar se a regulação deste íon é que foi importante para o equilíbrio apresentado pela espécie.

Com a análise de magnésio, foi observada diferença quando comparado o grupo em 25‰ e o de 0‰ em relação ao grupo aclimatado por 7 dias em 0‰. Devido à grande importância apresentada pelo magnésio (COWAN, 1995; FLATMAN, 1993; PUSCH *et. al.*, 1989; EBEL & GÜNTHER, 1980), supõe-se a existência de mecanismos eficientes para manter a homeostase deste íon. O valor mais elevado apresentado em 25‰ pode também ser explicado como resposta ao choque inicial sofrido pela redução de salinidade, tal como aconteceu para a osmolalidade. Estudos realizados com *Oreochromis mossambicus* mostram que em peixes aclimatados em água doce, a captura de magnésio é constante e ocorre principalmente pela dieta. A captura pode ocorrer também secundariamente pelas brânquias quando a dieta é pobre em magnésio ou este se encontra mesmo ausente (BIJVELDS *et. al.*, 1996). O jejum imposto aos robalos nos leva a concluir que os valores baixos apresentados pelos grupos aclimatados a 0‰ por 24 horas (0a) e por 7 dias (0b) são devido a falta de fonte de magnésio por alimentação, além da baixa concentração deste íons presente na água diluída, dificultando assim a captação de magnésio através das brânquias.

Os valores de glicose plasmática também não apresentaram variação entre as diferentes salinidades, porém houve grande variação dentro de cada grupo. O aumento nas concentrações de glicose plasmática está relacionado

com estresse em peixes (WENDELAAR BONGA, 1997). Mudanças nos valores plasmáticos de glicose também não foram observados em *Sphoeroides greeleyi* e *S. testudineus* (PRODOCIMO *et. al.*, 2008). Dada a pouca variância observada nos níveis de glicose em *C. parallelus*, pode-se concluir que o manejo e as mudanças gradativas de salinidade (5‰-dia) não levaram a respostas secundárias ao estresse por estes animais. Este resultado nos leva a comprovar a grande plasticidade osmorregulatória nesta espécie, e confirma observações anteriores de grande variabilidade individual neste parâmetro (PRODOCIMO *et. al.*, 2008).

O cortisol apresenta grande importância na adaptação de peixes a água salgada, além de sua importância na criação da plasticidade osmorregulatória tanto em água doce quanto salgada, quando aliado a outros hormônios (MCCORMICK, 1995; 2001). É também o principal indicador de estresse em peixes, sendo considerado a resposta primária a condições de perda de equilíbrio homeostático (WENDELAAR BONGA, 1997). No presente estudo os valores de cortisol não apresentaram variação significativa nos diferentes tratamentos de salinidade, essencialmente por causa do efeito do tempo de anestesia sobre este parâmetro corroborando estudo realizado com *Odontesthes bonariensis* onde não foi observada influência do protocolo de redução de salinidade nas concentrações de cortisol plasmático (TSUZUKI *et. al.*, 2007). Como a diminuição da salinidade é considerada como um potencial fator de estresse, o esperado para este protocolo era um aumento significativo para os níveis de cortisol. Por outro lado, como o cortisol é aparentemente mais atuante na adaptação à água do mar, a redução do cortisol com a redução de salinidade poderia também ser esperada (McCORMICK, 2001). Após análise dos resultados encontrados, foi observado um padrão bastante claro unindo os animais em que as amostras de sangue haviam sido retiradas primeiro e unindo os animais em que as amostras haviam sido retiradas por último. Com isso pode-se perceber que o tempo de exposição à benzocaína afetou claramente as leituras de cortisol relacionadas com a mudança gradual de salinidade, evidentemente mais do que a alteração de salinidade. Após análise unindo o efeito da salinidade e a influência do tempo sob anestésico, pode-se notar de fato a diminuição dos valores de cortisol com o protocolo de redução de salinidade, nos levando a confirmar a importância e maior atuação do

cortisol em água salgada.

A anestesia é alcançada quando ocorre uma perda completa ou parcial dos sentidos corporais devido à diminuição das funções nervosas (IWAMA & ACKERMAN, 1994). Em estudos realizados no Brasil, a benzocaína é o anestésico mais utilizado, por ser de fácil obtenção, baixo custo e seguro ao usuário. É um anestésico ideal para peixes pois não provoca diminuição no crescimento e na reprodução das espécies testadas até agora (ROUBACH & GOMES 2001). Com espécies nativas poucos estudos foram realizados, e já sabe-se hoje que os efeitos dos anestésicos são espécie-específicos. Estudos com o matrinxã *Brycon cephalus* (ROUBACH *et. al.*, 2001; CARNEIRO *et. al.*, 2002), o tambaqui *Colossoma macropomum* (GOMES *et. al.*, 2001) e o lambari-do-rabo *Astyanax altiparanae* (GIMBO *et. al.*, 2008) foram realizados a fim de se saber quais concentrações de anestésicos não afetam leituras plasmáticas, além de não fazer mal aos animais. Sem o conhecimento prévio da concentração e do tempo de exposição corretos à benzocaína, resultados de cortisol podem ser afetados, causando erro na interpretação da influência de diversos fatores analisados, como por exemplo a salinidade do meio. Dito isso, pode-se concluir que para o protocolo de redução de salinidade, aumentos na glicose e no cortisol, os quais podem ser classificados como indicadores de estresse em peixes, não foram observados. Apesar do efeito não intencional do tempo de anestesia sobre o cortisol, que acabou ficando bem claro e evidente, podemos concluir que estes animais não sofreram estresse significativo pela redução de salinidade.

Desta forma, podemos reforçar que seu cultivo tanto em água do mar, água salobra, ou mesmo água doce é adequado, pois a espécie *C. parallelus* possui grande plasticidade osmorregulatória. É de relativa importância que mais estudos sejam realizados a fim de se estabelecer quais valores são os ideais para um maior desenvolvimento e engorda destes animais, principalmente em indivíduos considerados juvenis adultos, pois estes apresentam grande valor comercial. Por fim, é também importante estabelecer qual concentração e tempo de benzocaína é a mais apropriada a esta espécie, pois valores elevados de ambas as variáveis podem causar erros de leitura, além de influenciar o desenvolvimento dos animais.

6. CONCLUSÃO

A espécie *Centropomus parallelus* apresenta grande plasticidade osmorregulatória, sendo a mudança de salinidade proposta pouco significativa sob os aspectos de osmolalidade, cloreto, magnésio, glicose e cortisol. O tempo de permanência dos animais em água com benzocaína diluída, mesmo a baixas concentrações, influenciou de maneira muito significativa o cortisol plasmático nos exemplares.

O estudo mostrou que se pode aclimatar em tempo relativamente curto e de maneira gradual o robalo-peva de 33‰ para água doce sem afetar sua homeostasia osmótica e iônica, e sem indicação de indução de estresse. Esta aclimação mostra-se importante para flexibilizar o cultivo desta espécie, podendo facilitar seu cultivo em cidades onde a disponibilidade de água do mar é difícil.

Exemplares de robalo-peva podem ser facilmente aclimatados em tempo relativamente curto e podem ser mandados para cultivo em cidades do interior, onde a água doce poderá ser usada para dar continuidade à criação. Outra possibilidade é o envio de animais em água salgada seguido de aclimação já no local onde os animais serão criados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVAREZ-LAJONCHÈRE, L.; CERQUEIRA, V. R.; SILVA I. D.; ARAÚJO, J.; REIS, M., 2004. First basis for a sustained juvenile production technology of fat snook *Centropomus parallelus* Poey. *Hidrobiológica* **14**(1), 37- 45.

ANUÁRIO BRASILEIRO DE PESCA ESPORTIVA, 2002. Editora Zillig p.150.

ARAÚJO, J.; CERQUEIRA, V. R., 2005. Influência da salinidade na incubação de ovos do robalo-peva (*Centropomus parallelus* Poey, 1860). *Acta Scientiarum Animal Sciencies*, **27**(1), 85-89.

BIJVELDS, M. J. C., FLIK, G., KOLAR, Z. I. AND WENDELAAR BONGA, S. E., 1996(a). Uptake, distribution and excretion of magnesium in *Oreochromis mossambicus*: dependence on magnesium in diet and water. *Fish Physiology and Biochemistry*, **15**, 287–298.

BOEUF, G. & PAYAN, P., 2001. How should salinity influence fish growth? *Comparative Biochemistry and Physiology* , **130**(C), 411-423.

CARNEIRO, P.C.F; URBINATI, E.C.; MARTINS, M.L., 2002. Transport whit different benzocaine concentrations and its consequences on hematological parameters and gill parasite population of matrinxã *Brycon cephalus* (Günther, 1869) (Osteichtyes: Characidae). *Acta Scientiarum*, **24**(2), 555-560.

CAVALHEIRO, J.M.; PERREIRA, J.A.; LEITE, R.L., 1998. The influence of feeding in limnological paramethers during experiments whit *Centropomus parallelus* (Poey, 1860) in fresh water. **Resumos Congresso Sul-Americano de Aqüicultura**, p.194.

CERQUEIRA, V.R., 1991. Testes de indução de desova do robalo *Centropomus parallelus*, do litoral da ilha de Santa Catarina, com gonadotrofina coriônica humana (HCG). CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA DE PESCA, 7, **Resumos Santos**.

CERQUEIRA, V.R., 2002. Cultivo do robalo: aspectos da reprodução, larvicultura e engorda. *UFSC - Ed. do Autor*, **94**.

CHAVEZ, H., 1963. Contribucion al conocimiento de la biología de los robalos, chucumite y constantino (*Centropomus spp.*) del estado de Veracruz. *Ciência*, **22**(3), 141-161.

COWAN, J. A., 1995. Introduction to the biological chemistry of magnesium ion. *The Biological Chemistry of Magnesium*, 1–23.

EBEL, H. & GÜNTHER, T., 1980. Magnesium metabolism: a review. *Journal of Clinical Chemistry & Clinical Biochemistry*, **18**, 257–270.

EMBRAPA Disponível em:
<http://www.cnpma.embrapa.br/projetos/index.php3?sec=aquic:::28>
Acessado em: 14 de julho de 2009.

EVANS, D. H.; PIERMARINI, P. M.; CHOE, K. P., 2005. The Multifunctional Fish Gill: Dominant Site of Gás Exchange, Osmoregulation, Acid-Base Regulation, and Excretion of Nitrogenous Waste. *Physiology Revisions.*, **85**, 97-177.

FAO, 1999. Yearbook of Fishery Statistics. Capture production. *FAO Statistics Series*. **88** (1), p.776.

FISHBASE Disponível em: <http://www.fishbase.org/Sumary/SpeciesSummary>
Acesso em: 14 de junho de 2009.

FLATMAN, P.W., 1993. The *role of magnesium in regulating íon transport*. **Magnesium and the Cell**. Editora N. J. Birch, 197–216.

GIMBO, R.Y.; SAITA, M.V.; GONÇALVES, A.F.N; TAKAHASHI, L.S., 2008. Diferentes concentrações da benzocaína na indução anestésica do lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax altiparanae*). *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, **9**(2), 350-357.

GOMES, L.C.; CHIPPARI-GOMES, A.R.; LOPES, N.P.; ROUBACH, R.; ARAUJOLIMA, C.A.R.M., 2001. Efficacy of benzocaine as na anesthetic in juvenile tambaqui *Colossoma macropomum*. *Journal of the World Aquaculture Society*, **32**, 426- 431.

GOZLAN, R.E., 2008. Introduction of non-native freshwater fish: is it all bad? *Fish and Fisheries*, **9**, 106-115.

GROSSEL, M.; GENZ, J.; TAYLOR, J.R.; PERRY, S.F.; GILMOUR, K.M. 2009. The involvement of H⁺ ATPase and carbonic anhydrase in intestinal HCO₃⁻ secretion in seawater-acclimated rainbow trout. *The Journal of Experimental Biology*, **212**, 1940-1948.

GREENWOOD, P. H., 1976. A review of the Family Centropomidae (Pisces, Perciformes). Bulletin of British Museum (Natural History). *Zoology*, **29**(1), 1-81.
GROSSEL, M.; GENZ, J.; TAYLOR, J.R.; PERRY, S.F.; GILMOUR, K.M. 2009. The involvement of H⁺ ATPase and carbonic anhydrase in intestinal HCO₃⁻ secretion in seawater-acclimated rainbow trout. *The Journal of Experimental Biology*, **212**, 1940-1948.

HWANG, P. P; LEE, T. H., 2007. New insights into fish ion regulation and mitochondrion-rich cells. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **148**(a), 479-497.

INSTITUTO NACIONAL DE LA PESCA (2005). *Breviário de la pesquería de robalo del Golfo de México*. Disponível em: <<http://www.inp.sagarpa.gov.mx/Publicaciones/sustentabilidad/Golfo/RobaloBlanco.pdf>> Acesso em: 17 de junho de 2008.

ITAGAKI, K. I. 2005. **Potencial de Recrutamento das Larvas e juvenis de robalo-peva, *Centropomus parallelus* (Teleostei: Centropomidae) no Sistema Cananéia-Iguape, São Paulo, Brasil. São Paulo.** Tese de Doutorado em Oceanografia Biológica – Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo.

IWAMA, G.; ACKERMAN, A., 1994. Analytical techniques in biochemistry and molecular biology of fishes. *Elsevier Science*, **3**(1), 1-5.

MARSHALL, W.S., BRYSON, S.E., LUBY, T., 2000. Control of epithelial Cl⁻ secretion by basolateral osmolality in the euryhaline teleost *Fundulus heteroclitus*. *Journal of Experimental Biology*, **203**, 1897–1905.

MADSEN, S.S., 1990(a). Cortisol treatment improves the development of hypoosmoregulatory mechanisms in the euryhaline rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Fish Physiology and Biochemistry*, **8**, 45-52.

MCCORMICK, S.D., 1995. Hormonal control of gill Na⁺, K⁺-ATPase and chloride cell function. *Fish Physiology*, **14**, 285-315.

PATRONA, L., 1984. **Contribution à la biologie du robalo *Centropomus parallelus* (Pisces Centropomidae) du sud-est du Brésil: possibilités aquacoles.** Tese (Biologie et Physiologie Animales) - Institut. Nacional Polytechnique de Toulouse. Toulouse.

PRODOCIMO, V.; SOUZA, C.F.; PESSINI, C.; FERNANDES, L.C.; FREIRE, C.A., 2008. Metabolic substrates are not mobilized from the osmoregulatory organs (gills and kidney) of the estuarine pufferfishes *Sphoeroides greeleyi* and *S. testudineus* upon short-term salinity reduction. *Neotropical Ichthyology*, **6**(4), 613-620.

RIVAS, L. R. 1986. Sistematic Review of the Perciform fishes of the genus *Centropomus*. *Copeia*, **3**, 579-611.

ROCHA, J.A. da SILVA; GOMES, V.; NEGAN, P.V.; PASSOS, M.J.A.C.R.; FURIA, R.R., 2004. Metabolic demand and growth of juveniles of *Centropomus parallelus* as function of salinity. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **316**, 157-165.

ROJAS, J.C., 1972. Contribucion al conocimiento de la biologia de las lagunas y rios de Campona y Buena Vista (Venezuela), especialmente del robalo *Centropomus parallelus*, Poey. *Cuadernos Oceanograficos Universidad de Oriente*, **3**, 3-36.

ROUBACH, R.; GOMES, L.C., 2001. O uso de anestésicos durante o manejo de peixes. *Revista Panorama da Aquicultura*, **11**(66), 37-40.

ROUBACH, R.; GOMES, L.C.; VAL, A.L. 2001. Safest level of tricaine methanosulfanate (MSS-222) to induce anesthesia in juveniles of matrinxã (*Brycon cephalus*). *Acta Amazonica*, **31**,159-163.

SCHIMIDT-NIELSEN, K., 1996. **Fisiologia Animal**, p. 313-320. Editora Santos.

SEAP Disponível em: <http://www.seap.pr.gov.br/> Acessado em: 22 de julho de 2009.

TAKAHASHI, L.S; BILLER, J.D.; URBINATI, E.C., 2006. **Efeito do ambiente pós-transporte na recuperação dos indicadores de estresse de pacus juvenis, *Piaractus mesopotamicus***. *Acta Scientiarum Animal Sciences*, **28**(4), 469-475.

TSUZUKI, M.Y.; CERQUEIRA, V.R.; TELES, A.; DONEDA, S., 2007. Salinity Tolerance of Laboratory Reared Juveniles of The Fat Snook *Centropomus parallelus*. *Brazilian journal of Oceanography*, **55**(1), 1-5.

TSUZUKI, M.Y.; OGAWA, K.; STRÜSSMANN, C.A.; TAKASHIMA, F.; MELO, C.M.R. 2007. The significance of cortisol on acclimation to salinity in pejerrey *Odontesthes bonariensis*. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, **59**(5), 1301-1307.

VARSAMOS, S.; NEBEL, C. & CHARMATIER, G., 2006. Ontogeny of osmoregulation in postembryonic fish: A review. *Comparative Biochemistry and Physiology*. **141**(4), 401-429.

WENDELAAR BONGA, S.E., 1997. The stress response in fish. *Physiological Reviews*, **77**, 591-625.